

**PHARMAKOKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN
MIT ZWEI NIEDERMOLEKULAREN
PROTEINASEINHIBITOREN AUS LEGUMINOSEN**

Sebastian Wartenberg

—

1980
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551902_0038

Aus der Abteilung für
Klinische Chemie und Klinische Biochemie
in der Chirurgischen Klinik der Universität München
Leiter: Prof. Dr. Hans Fritz

PHARMAKOKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN MIT ZWEI
NIEDERMOLEKULAREN PROTEINASEINHIBITOREN
AUS LEGUMINOSEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sebastian Wartenberg

aus
Ingolstadt

Jahr

1980

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Fritz

Mitberichterstatter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6. November 1980



Meiner lieben Mutter in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	CHARAKTERISTIK DER TRYPSIN- CHYMOTRYPSIN-INHIBITOREN AUS SOJA- UND LIMABOHNEN	1
2.	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	5
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN:	
3.1.	Material und Methoden	9
3.1.1.	Proteinasehemmtest	9
3.1.2.	Verwendete Inhibitoren	10
3.1.3.	Pharmakokinetische Messungen an Versuchstieren	13
3.2.	Ergebnisse:	15
3.2.1.	Pharmakokinetische Messungen mit dem Inhibitor aus Soja- bohnen (Bowman-Birk) im Hunde- und Kaninchenkreislauf	15
3.2.2.	Pharmakokinetische Messungen mit dem Inhibitor aus Lima- bohnen im Kaninchenkreislauf	17
3.2.3.	Organverteilung des Bowman-Birk- Inhibitors bei Ratten	18
3.3.	Makromolekular gebundener Inhibitor:	22
3.3.1.1.	Charakteristik von Dextran-70	22
3.3.1.2.	Darstellung von Dextran-70 gebundenem Bowman-Birk-Inhibitor	24

	Seite
3.3.1.3. Pharmakokinetische Messungen	29
3.3.2.1. Charakteristik von Poly-N-vinyl- pyrrolidon (PVP)	32
3.3.2.2. Darstellung von PVP-gebundenem Bowman-Birk-Inhibitor	34
3.3.2.3. Pharmakokinetische Messungen	40
3.3.3. Proteinmaskierung durch Liposomen	43
3.3.3.2. "Maskierung" des Bowman-Birk- Inhibitors in Liposomen	44
4. DISKUSSION	48
5. ZUSAMMENFASSUNG	54
6. VERZEICHNIS DER IM TEXT VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	57
7. LITERATURVERZEICHNIS	58

1. CHARAKTERISTIK DER TRYPSIN-CHYMOTRYPSIN-INHIBITOREN AUS SOJA- UND LIMABOHNEN

Im Pflanzenreich kommen weit verbreitet Proteinaseinhibitoren vor. So konnten aus den Samen verschiedenster Getreidesorten, aus Leguminosen wie auch aus Rüben, Kartoffeln, Nüssen und Mais Proteinasehemmstoffe isoliert werden (45). Hinsichtlich des Hemmspektrums, der Struktur und auch der physiologischen Bedeutung sind Inhibitoren aus Leguminosen wie z. B. der Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus Sojabohnen und Limabohnen am besten von diesen pflanzlichen Proteinasehemmstoffen charakterisiert (10,11).

Ein Rohextrakt des Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitors aus Sojabohnen kann durch Extraktion mit 60 %-igem Äthanol aus Sojabohnenmehl gewonnen werden. In 100 g Sojabohnenmehl sind 200 mg Inhibitorprotein enthalten. Durch verschiedene Isolierungstechniken konnte durch Birk und Mitarbeiter (4,5) der niedermolekulare, säurestabile Sojabohneninhibitor (Typ: Bowman-Birk) rein dargestellt werden. Die vollkommene Primär- und Sekundärstruktur dieses Proteins wurde durch Odani und Ikenaka aufgeklärt (21,22). Im Vergleich mit Aminosäuresequenzen anderer Inhibitoren pflanzlicher Herkunft

konnte dabei eine hohe Homologie zum Limabohneninhibitor festgestellt werden (41).

Der niedermolekulare Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus Sojabohnen (Abb. 1) ist säure- und hitzestabil. Im destillierten Wasser löst sich dieses Protein nur mäßig, dagegen in 2 %-iger Essigsäure vollständig auf. Das Inhibitorprotein mit dem Molekulargewicht von 8000 enthält keine Carbohydratanteile, kein Tryptophan und keine freien SH-Gruppen. Pepsin baut das native Protein nicht ab. Der Isoelektrische Punkt liegt bei 4,2.

Das Inhibitormolekül wird aus einer Peptidkette gebildet und zeigt in seiner sekundären Struktur eine Aufteilung in zwei Hälften, welche untereinander in der Anordnung der Aminosäuren eine hohe Homologie aufweisen. Eine dieser Molekülhälften, die auch als "loop" bezeichnet werden, enthält das Trypsin-hemmzentrum Lys¹⁶ - Ser¹⁷ und hemmt zusätzlich trypsinähnliche Enzyme wie Plasmin und auch Pronase. Die andere Hälfte enthält das Chymotrypsin-hemmzentrum Leu⁴³ - Ser⁴⁴ und ist zusätzlich für die Inaktivierung menschlicher Granulozytenelastase und Kathepsin-G verantwortlich (32). Elastase aus menschlichem Pankreas wird dagegen nicht durch den Bowman-Birk-Inhibitor komplexiert. Beide Hemmzentren befinden sich in Peptidschleifen mit insgesamt neun Aminosäuren und werden durch eine Disulfidbrücke stabilisiert.

Beide Molekülhälften sind durch zwei Peptidbrücken mit sechs (Val⁵² - Phe⁵⁷) bzw. sieben Aminosäuren (Ser²⁵ - Ser³¹) miteinander verbunden.

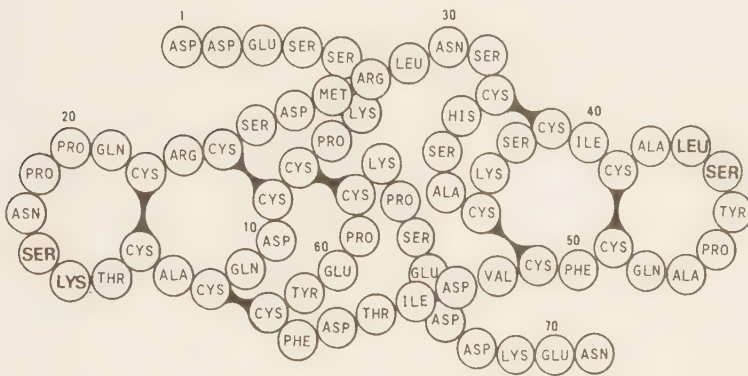


Abb.1 Vollständige kovalente Struktur des Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitors aus Sojabohnen (Bowman-Birk) nach S. Odani und T. Ikenaka (22)

Die Zerstörung der Disulfidbrücken durch Oxidation mit Per-Alpha-Ameisensäure führt zu einem vollständigen Verlust der inhibitorischen Aktivität gegen Trypsin und Chymotrypsin.

Ein weiterer niedermolekularer Proteinasehemmstoff ist der Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus Limabohnen. Er ist ebenfalls säure- und hitzestabil und in 2 %-iger Essigsäure gut löslich. Das Inhibitorprotein mit dem Molekulargewicht von etwa 9000 enthält kein Tryptophan und Methionin, jedoch ähnlich wie der Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus Sojabohnen einen hohen Anteil an Disulfidbrücken. Ähnlich wie das aus Sojabohnen ist dieses Inhibitorprotein aus zwei Molekülhälften aufgebaut, wobei die eine Hälfte in ihrer Hemmaktivität gegen Trypsin, die andere gegen Chymotrypsin gerichtet ist. Dieser Inhibitor hemmt auch Granulozytenelastase und Kathepsin-G (32). Als Trypsinhemmzentrum konnten die Aminosäuren Lys¹⁶-Ser¹⁷, als das Chymotrypsinhemmzentrum die Aminosäuren Leu⁴³-Ser⁴⁴ nachgewiesen werden (41).

2. ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT

Lysosomale Granula von neutrophilen, polymorphkernigen Leukozyten beinhalten ein hohes proteolytisches Potential, bestehend aus Proteinasen unterschiedlichster Spezifität und Wirkungsweise. So weiß man, daß etwa 60 % des Proteinanteils dieser Granula aus Elastase besteht. Neben dieser Granulozytenelastase wurden ein chymotrypsinähnliches Enzym, das sog. Kathepsin-G und eine kollagenolytische Protease isoliert und biochemisch eingehend charakterisiert (2,6,9,16,23,24). Daneben findet man noch im sauren Medium wirksame Proteasen, sog. Kathepsine, sowie einen Plasminogenaktivator und auch Enzyme des Kallikrein-Kininsystems, sog. Kininogenasen und Kininasen (16,19,20).

Im Verlaufe der Sepsis, bei akuter Leukämie und auch bei Erkrankungen des arthritischen Formenkreises werden Granulozyten vermehrt degranuliert und die oben genannten Proteinase in das umgebende Milieu freigesetzt. Es wird bei diesen Krankheiten den neutralen Proteinase, speziell der Elastase und dem Kathepsin-G, auf Grund ihrer hohen Konzentration in den Granula und ihrer optimalen Wirkung bei physiologischen pH-Werten eine entscheidende Bedeutung beigemessen.

Aus in vitro Versuchen aber auch aus in vivo Experimenten ist bekannt, daß Elastase und Kathepsin-G sowohl Gerinnungs- als auch Komplementfaktoren, Immunglobuline (28,33,36,43,44), aber auch Bausteine des Bindegewebes, wie Elastin, Proteoglykane und Kollagen proteolytisch abbauen können (38-40). Zusätzlich diskutiert man die Beteiligung speziell von Elastase bei der Zerstörung von elastischem Lungengewebe und der damit verbundenen Bildung des hereditären Lungenemphysems wie auch die Schädigung des elastischen Gefäßwandgewebes bei Arteritiden (17).

Physiologischerweise werden diese Proteasen in der Blutbahn durch hochmolekulare Plasmainhibitoren inhibiert. Leukozytenelastase und Kathepsin-G werden z. B. von Alpha₁-Antitrypsin, Alpha₂-Makroglobulin und Alpha₁-Antichymotrypsin komplexiert (25,26). In menschlichen Sekreten wie z. B. Bronchial- und Zervikalsekret, aber auch im Spermaplasma (29-31) existiert ein weiterer, niedermolekularer Hemmstoff gegen Elastase und Kathepsin-G.

Im photometrischen Testsystem konnte gezeigt werden, daß Elastase und Kathepsin-G auch von anderen natürlichen Proteinasehemmstoffen reversibel inaktiviert werden, so z. B. durch Trypsin-Chymotrypsin-Hemmstoffe aus Hundesubmandibularisdrüsen, durch Eglin, einem Hemmstoff aus Blutegeln und Elastatinal, einem Peptidaldehyd aus Streptomyces griseoruber,

welches spezifisch Elastase hemmt. Außerdem konnte die Inaktivierung von Elastase und Kathepsin-G durch Leguminoseinhibitoren wie den Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus Sojabohnen und den Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus Limabohnen nachgewiesen werden (32,34).

Der Nachweis der Beteiligung der neutralen Leukozytenproteasen am Pathomechanismus von Gerinnungsstörungen im Laufe der akuten gramnegativen Sepsis ist Gegenstand weiterführender Arbeiten. Dabei sollen die durch Endotoxin freigesetzten, neutralen Proteasen durch intravenöse Gabe eines spezifischen Elastase-Kathepsin-G-Hemmstoffes inaktiviert werden. Auf Grund des relativ unerschöpflichen Vorkommens und der problemlosen Gewinnung aus den Rohmaterialien bieten sich Inhibitoren pflanzlicher Herkunft zur therapeutischen Anwendung an. Ziel dieser Arbeit war es nun, für diese Elastase-Kathepsin-G-Inhibitoren aus Sojabohnen bzw. Limabohnen die Pharmakokinetik in verschiedenen Versuchstieren zu erfassen. Auf Grund der niedrigen Molekulargröße von 8000 sollte dieses Proteininhibitormolekül glomerulär filtriert werden und deshalb nur eine kurze Verweildauer im Blutkreislauf aufweisen. Um diese Verweildauer des Inhibitorproteins im Kreislauf zu verlängern, kennt man die kovalente Koppelung von Proteinen an lösliche und biologisch innerte Trägermaterialien (1,14). Dabei sollte als Trägermaterial Dextran-70 wie auch Poly-N-vinylpyrrolidon erprobt werden. Zusätzlich sollte die "Verpackung" des Inhibitorproteins

in sphärischen Lipopolysacharidstrukturen sog. Liposomen (7,15,42) versucht werden.

Für die anschließend durchgeführten Tierexperimente war es außerdem von grundlegender Bedeutung zu wissen, ob und wie weit sich diese Leguminoseinhibitoren in bestimmten Organen anreichern und gegebenenfalls deren Funktion beeinträchtigen.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Proteinasehemmtest

Die Bestimmung der Hemmung von Trypsin und der Granulozytenelastase erfolgte nach bekannten photometrischen Methoden (12,27,29). Die angegebenen Inhibitor-Einheiten (IU) beziehen sich auf die Hemmung von Trypsin, gemessen mit dem synthetischen Substrat N-Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid. Eine Inhibitoreinheit (IU) entspricht dabei der Verminderung der Substratspaltung um $1 \mu\text{mol}$ Enzym pro Minute.

0,1 ml Trypsinlösung (10 mg/100 ml 25 mM HCL), 1,9 - xml Triäthanolaminpuffer (0,2 M, pH = 7,8) und xml Inhibitorlösung werden 5 Minuten in der Küvette inkubiert und dann mit 1 ml 0,05 %-igen wässrigen N-Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid-Lösung vermischt. Die Freisetzung von Paranitroanilid kann

durch die Extinktionsänderung pro Minute bei 405 nm verfolgt werden. Eine Extinktionsänderung von 3,32 pro Minute bei 1 cm Lichtweg entspricht einer Aktivität von 1 U.

3.1.2. Verwendete Inhibitoren

Für unsere pharmakokinetischen Untersuchungen an Hund, Kaninchen und Ratte haben wir hochgereinigte Inhibitorpräparate verwendet. Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung des niedermolekularen Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitors aus Sojabohnen (Bowman-Birk-Inhibitor = BBI) diente uns ein Sojabohneninhibitorextrakt der Firma Serva (Artikel Nr. 37 340). Dieses Präparat enthält neben dem niedermolekularen Bowman-Birk-Inhibitor den hochmolekularen, säureinstabilen Sojabohneninhibitor vom Kunitztyp. Die spezifische Trypsinhemmaktivität dieses Präparates beträgt 1,8 IU/mg.

Durch Molekularsiebung an Sephadex G - 75 (siehe Abb. 2) ist eine nahezu vollständige Abtrennung des niedermolekularen Bowman-Birk-Inhibitors (MG = 8000) vom höhermolekularen Inhibitor vom Kunitztyp (MG = 22 000) möglich. Nach dieser Gelchromatographie zeigt das Bowman-Birk-Inhibitorpräparat eine spezifische Trypsinhemmaktivität von 2,9 IU/mg, was einer Reinheit des Präparates von 96,6 % entspricht. Zusätzlich

kann bei dieser Chromatographie das Molekulargewicht des Inhibitorpräparates abgeschätzt werden. Der dabei resultierende Wert von 8000 stimmt vollkommen mit dem theoretischen Wert, der sich aus der Aminosäure und Strukturanalyse errechnet, überein (3,22). Als zusätzliches Reinheitskriterium wurde vom verwendeten Präparat eine Aminosäureanalyse angefertigt. Die daraus resultierenden Werte stimmen mit denen von Birk (3) beschriebenen Werten nahezu vollständig überein.

Für die pharmakokinetischen Messungen mit dem Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus Limabohnen (41) wurde ein Inhibitorpräparat der Firma EGA Chemie Artikel Nr. 85 438 - 7 verwendet. Die spezifische Trypsinhemmaktivität von 3 IU/mg entspricht nahezu dem theoretischen Wert; eine weitere Säuberung dieses Präparates war deshalb für unsere Zwecke nicht nötig.

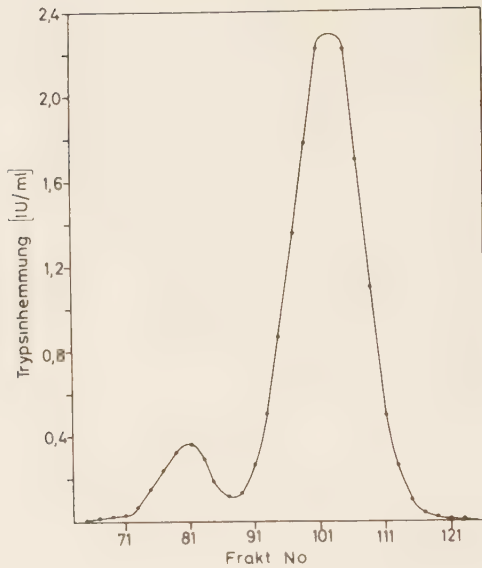


Abb.2 Gelchromatographische Auftrennung an Sephadex G-75 des Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitors (Typ: Bowman-Birk) vom hochmolekularen Inhibitor (Typ: Kunitz) aus einem käuflichen Sojabohnenpräparat.

Säule: 110x4,2 cm, 10°C; Flußrate: 140 ml/h
Fraktionsvolumen: 5 ml; Elutionsmittel:
Essigsäure (2%)

3.1.3. Pharmakokinetische Messungen an Versuchstieren

Zu den pharmakokinetischen Messungen wurden die Inhibitorlösungen (4 ml, Lösungsmittel: physiologische Kochsalzlösung, pH = 7,4) den gewogenen und mit Nembutal narkotisierten Bastardhunden in die V.femoralis injiziert.

Bei Kaninchen und Albinoratten wurde eine entsprechende Inhibitorlösung in die Ohrvene bzw. in die Schwanzvene injiziert. Zu bestimmten Zeitpunkten p. i. (Abb. 4,5,11) wurden bei Hunden und Kaninchen Blutproben entnommen.

Die Ratten wurden nach 0,5, 1, 2, 3 und 24 Stunden p. i. durch Dekapitation entblutet, die Organe extirpiert und sofort aufgearbeitet. Bis zum Zeitpunkt der Tötung wurde der ausgeschiedene Urin gesammelt, wobei die Sammlung entweder unter Verwendung eines Stoffwechselkäfigs oder auch durch Eröffnung der Blase nach Tötung des Versuchstiers erfolgte.

Das beim Zentrifugieren des Blutes (3000 Umdrehungen pro Minute) gewonnene Serum wurde mit dem gleichen Volumen 6 %iger Perchlorsäure versetzt. Der beim Ansäuern ausgefallene Niederschlag wurde abzentrifugiert, die saure Lösung mit 5 M K_2CO_3 Lösung neutralisiert und das unlösliche Kaliumperchlorat nach kurzem Stehen der Probe bei 0°C abzentrifugiert. Der neutrale Überstand wurde zur Bestimmung der Inhibitorkonzentration verwendet.

Die Organe wurden sofort nach ihrer Entnahme nach Zugabe von 1 ml Wasser und 2 ml 6 %iger Perchlorsäure pro Gramm Gewebe unter Eiskühlung homogenisiert (Ultraschallgerät von Bronson Sonic Power). Die unlöslichen Gewebsanteile wurden abzentrifugiert, der Überstand mit 5 M K_2CO_3 neutralisiert, das ausgefallene Kaliumperchlorat abzentrifugiert und die neutralen Extrakte zum Trypsinhemmtest eingesetzt. Die Verdünnung bei den Organextrakten wurde nach Multiplikation der gefundenen Inhibitormengen mit dem Verdünnungsfaktor (Serum:2, Organe:4) berücksichtigt. Zur Berechnung der Inhibitormenge im Blut wurden folgende Faktoren (13) verwendet: 6,7 ml Blut entsprechen 3,7 ml Serum pro 100 g Körpergewicht bei Ratten. Die Bestimmung der InhibitorKonzentration im Harn erfolgte ohne weitere Vorbehandlung, da sich die Menge durch Enteiweißen des Harns nicht veränderte.

Um den Eigengehalt der Organe der behandelten Albinoratten zu berechnen, wurden die in den Organen von unbehandelten Versuchstieren gefundenen mittleren Konzentrationen an säurestabilen Trypsinhemmstoffen pro Gramm Gewebe bzw. ml Serum mit den Organgewichten bzw. Serumvolumina der zu den betreffenden Versuchen verwendeten Ratten multipliziert. Die so erhaltenen Leerwerte wurden in allen Fällen vom gefundenen Inhibitorgehalt der mit Inhibitor behandelten Tiere abgezogen.

3. 2. Ergebnisse:

3.2.1. Pharmakokinetische Messungen mit dem Inhibitor aus Sojabohnen (Bowman-Birk) im Hunde- und Kaninchenkreislauf

Die Inhibitormenge, die in den Hundekreislauf eingebracht wurde betrug 16,6 IU/kg Körpergewicht, die Inhibitormenge, die in den Kaninchenkreislauf injiziert wurde betrug 10 IU Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus Sojabohnen pro kg Körpergewicht.

Nach intravenöser Injektion beobachtet man zunächst ein rasches Absinken des Inhibitorspiegels im Blut, das mit Abdiffundieren des Proteinhemmstoffes in den extravasalen Raum zu erklären ist (Abb.3 und 4). Nach 30 Minuten stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht zwischen Blut und extravasaler Flüssigkeit ein. Die weitere, langsamere Abnahme der Inhibitor-konzentration im Blut ist auf die Elimination durch die Niere zurückzuführen. Die Halbwertszeit der Elimination des Inhibitor-proteins aus dem Kreislauf errechnet sich nach Dost (8) aus der Steilheit der Eliminationsgeraden und beträgt sowohl für den Hund, als auch für das Kaninchen 65 Minuten.

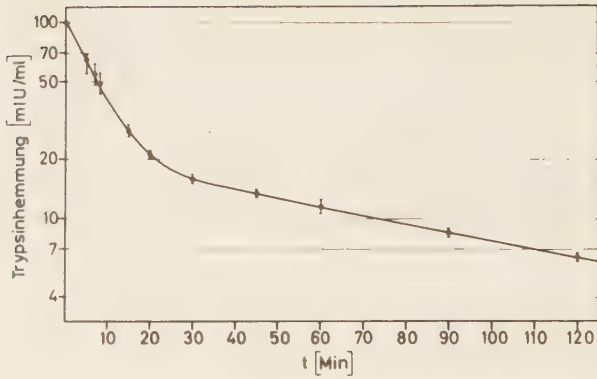


Abb.3 Serum-Inhibitorspiegel bei Hunden nach intra-
venöser Injektion des Trypsin-Chymotrypsin-
Inhibitors aus Sojabohnen (Bowman-Birk)
Injizierte Inhibitormenge: 16,6 IU/kg Körpergewicht

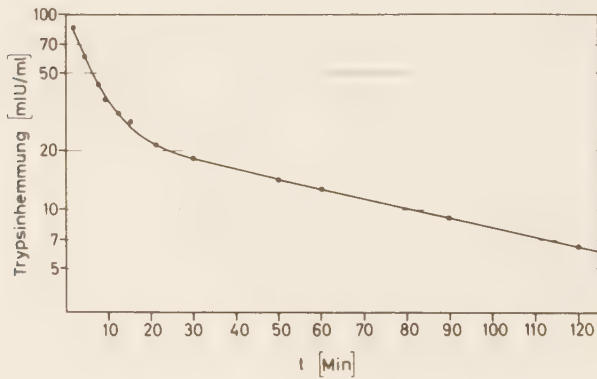


Abb.4 Serum-Inhibitorspiegel bei Kaninchen nach intra-
venöser Injektion des Trypsin-Chymotrypsin-
Inhibitors aus Sojabohnen (Bowman-Birk)
Injizierte Inhibitormenge: 10 IU/kg Körpergewicht

3.2.2. Pharmakokinetische Messungen mit dem Inhibitor aus Limabohnen im Kaninchenkreislauf

Auf Grund der nahezu Übereinstimmenden Molekülgröße der beiden Leguminoseinhibitoren (Molekulargewicht von Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus Sojabohnen = 8000; Limabohneninhibitor, MG = 9000) ist zu erwarten, daß das pharmakokinetische Verhalten des Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitors aus Limabohnen mit dem aus Sojabohnen nahezu Übereinstimmt. Die Inhibitor-konzentration im Kaninchenkreislauf nach intravenöser Injektion von 19 IU/kg Körpergewicht ist in Abb. 5 dargestellt. Wie unsere Messungen gezeigt haben, ist die Pharmakokinetik von Limabohneninhibitor mit dem aus Sojabohnen fast identisch. Das Verteilungsgleichgewicht stellt sich nach 30 Minuten ein. Die ebenfalls nach Dost bestimmte Halbwertszeit der Elimination aus dem Kreislauf beträgt 65 Minuten.

-

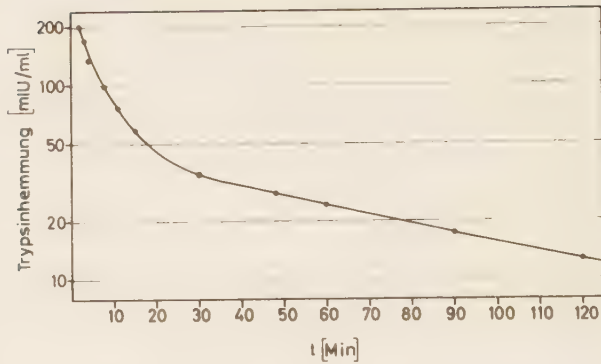


Abb.5 Serum-Inhibitorspiegel bei Kaninchen nach intra-
venöser Injektion des Trypsin-Chymotrypsin-
Inhibitors aus Limabohnen
Injizierte Inhibitormenge: 19 IU/kg Körpergewicht

3.2.3. Organverteilung des Bowman-Birk-Inhibitors bei Ratten

Nach intravenöser Injektion von 5,9 IU Inhibitorlösung in die Schwanzvene der Ratten, wurden die Versuchstiere nach bestimmten Zeitpunkten: 0,5, 1, 2, 3 und 24 Stunden dekapitiert, entblutet und die Organe extirpiert.

Das gewonnene Serum und die Organe wurden sofort wie unter 3.1.3. beschrieben aufgearbeitet und die neutralen Lösungen zum Test eingesetzt.

Wie aus der Abb. 6 zu ersehen ist, sinkt die Bowman-Birk-Inhibitorkonzentration im Blut der Ratte, wie auch im Hunde- und Kaninchenkreislauf beobachtet wurde rasch ab.

Eine Stunde p. i. beträgt die Seruminhitorkonzentration nur noch 7,5 % der injizierten Menge, fällt dann weiterhin langsamer ab um nach 2 Stunden p. i. auf 3,8 % der Ausgangsmenge und nach 3 Stunden auf 2,1 % abzufallen.

Es ist anzunehmen, daß das Inhibitorprotein aus dem Blut nach der intravenösen Injektion in den extravasalen Raum abdiffundiert, und entsprechend dem Fick'schen Diffusionsgesetz bei Abnahme der Konzentration im intravasalen Raum die Inhibitorkonzentration im extravasalen durch Rückdiffusion ebenfalls abnimmt. So erfolgt eine stetige Ausscheidung durch die Nieren. Mit unserem Testsystem war nach 24 Stunden im Serum kein Sojabohneninhibitor mehr nachweisbar.

Der Inhibitor erscheint in seiner aktiven Form im Harn der Ratte: Nach 30 Minuten p. i. findet man 5 % der injizierten Menge, weiterhin steigt die Ausscheidungskurve steil an um nach 2 Stunden 25 % und nach 24 Stunden 57 % der Ausgangsmenge an aktivem Inhibitor aufzuweisen.

Die Inhibitorkonzentration in der Niere beträgt nach 30 Minuten p. i. 1,3 %; nach 1 Stunde p. i. fanden wir einen Maximalwert von 15 % der injizierten Ausgangsmenge.

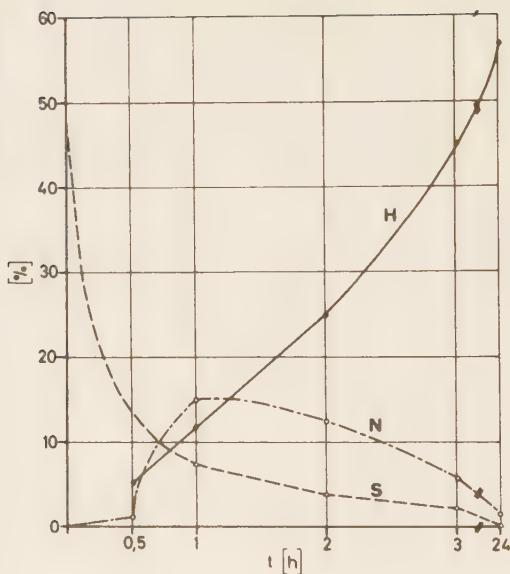


Abb.6 In den Organen der Ratte zu verschiedenen Zeitpunkten insgesamt wieder auffindbare Inhibitoraktivität nach Injektion des Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitors (Bowman-Birk)
(S = Serum, N = Niere, H = Harn)

In den folgenden Stunden (2 Stunden = 12,5 %, 3 Stunden = 6,0 %) fällt die InhibitorKonzentration langsam aber stetig ab und erreicht nach 24 Stunden einen Wert von 1,2 %. Die maximale InhibitorKonzentration in den Nieren fällt mit der Zeitdauer

der höchsten Filtrationsrate des Bowman-Birk-Inhibitors zusammen. Eine selektive Anreicherung dieses Inhibitorproteins in den Nierentubuli wie man es vom basischen Trypsininhibitor aus Rinderlunge (Trasylol^R) (13) kennt, erfolgt nicht.

Die Konzentration an Inhibitorprotein in Leber, Lunge und Milz übertraf zu keinem der angegebenen Zeitpunkte den Wert von 1 % der injizierten Ausgangsmenge.

Somit ist also eine spezifische Anreicherung des Inhibitorproteins in den untersuchten Organen nicht gegeben und eine Schädigung eines solchen Organs durch vermehrte Proteineinlagerung nicht zu befürchten.

3.3. Makromolekular gebundener Inhibitor:

3.3.1.1. Charakteristik von Dextran-70

Dextrane sind hochpolymerisierte D-Glukopyranoseeinheiten, die durch glykosidische Bindung verknüpft sind. Verschiedene Spezies von Bakterien können aus Zucker diese Polymere produzieren. Das für unsere Versuche verwendete Dextran-70 leitet sich von einem nativen Dextran ab, das von *Leuconostoc mesenterioides* produziert wird. Ungefähr 95 % der Hauptketten wie auch der Seitenkettenverknüpfungen sind Alpha-1,6-Glykosidbindungen. Die Seitenketten sind mit der Hauptkette durch Alpha-1,3-Glykosidbindungen verknüpft.

Das von uns verwendete Dextran zeigt ein durchschnittliches Molekulargewicht von $(\bar{M}_w) = 70\ 000$. Es ist durch das Einführen von 2-Hydroxy-3-Brompropylgruppen aktiviert (BHP-aktiviertes Dextran-70). Durch Behandlung mit Natronlauge bei pH = 11 für 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur werden diese reaktiven Gruppen in das entsprechende Epoxid übergeführt (siehe Formel).



(Dx = Dextran)

Abb.7 Reaktionsmechanismus der Aktivierung eines Dextranmoleküls. Die 2-Hydroxy-3-Brompropylgruppe wird bei pH 11 in das entsprechende Epoxid übergeführt.

Die Koppelung des Inhibitors an BHP aktiviertes Dextran-70 im alkalischen Medium geschieht dabei höchst wahrscheinlich über einen nucleophilen Angriff der terminalen, primären Aminogruppe des Proteins an der Epoxidgruppe von Dextran-70.

3.3.1.2. Darstellung von Dextran-70 gebundenem Bowman-Birk-Inhibitor

In 20 ml Natriumboratpuffer (0,1 M; pH = 9,0) werden 1 g aktiviertes Dextran-70 gelöst. 100 mg des Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitors aus Sojabohnen werden in 5 ml dieses Boratpuffers in Lösung gebracht. Die Koppelung des Inhibitorproteins an das aktivierte Dextran-70 erfolgt durch 20-stündiges Rühren bei Raumtemperatur. Dabei muß der pH-Wert der Reaktionslösung mehrmals nachgeprüft und nötigenfalls auf pH = 9,0 nachgestellt werden. Nach dieser Reaktion wird zum Reaktionsgemisch Äthanolamin in einer Endkonzentration von 0,1 M zugegeben. Damit wird eine Absättigung der reaktiven Bindungsstellen am Dextran-70 erreicht, die nicht mit Inhibitorprotein umgesetzt wurden. Diese Reaktion ist nach weiteren 24 Stunden bei Raumtemperatur abgeschlossen. Das resultierende Reaktionsgemisch kann nun durch Gelchromatographie an Sephadex G-75 fraktioniert werden.

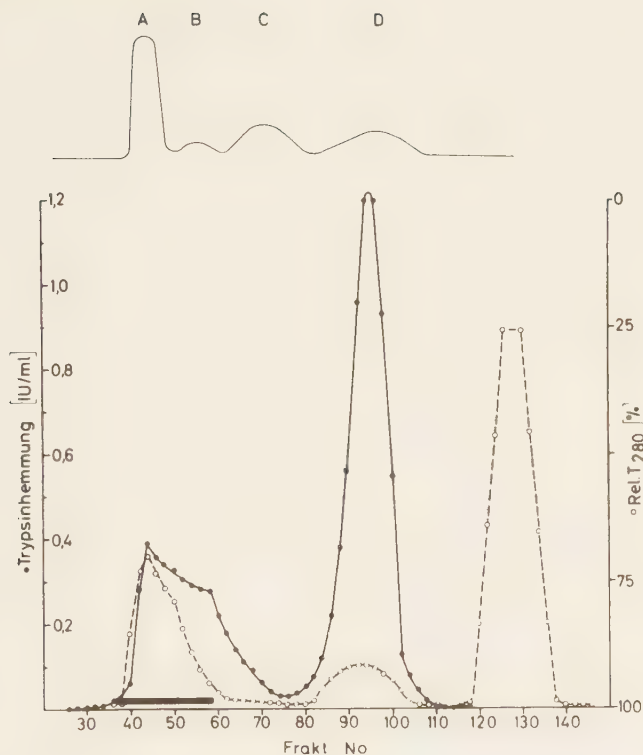


Abb.8 Gelfiltration an Sephadex G-75 des bei Bindung von Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitors aus Sojabohnen an Dextran-70 entstandenen Reaktionsgemisches.

zu Abb.8

Säule: 110 x 4,2 cm; 10°C
Fraktionsvolumen: 25 ml;

Flußrate: 140 ml/h
Elutionspuffer: Essigsäure (2%)

Das im oberen Teil der Abbildung sichtbare Elutionsprofil gibt die Kalibrierung der Säule unter den selben Bedingungen wieder.

Eichsubstanzen: A = Dextranblau (Ausschlußgrenze)
B = Trypsin-Inhibitor Ovomuroid (MG: 45000)
C = Chymotrypsinogen (MG: 24000)
D = Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus
Sojabohnen (Bowman-Birk) (MG = 8000)

Wie aus der Abbildung Nr. 8 hervorgeht, trennt sich dieses Gemisch in zwei trypsininhibitorisch aktive Fraktionen auf. Die Inhibitorfraktionen ab dem Ausschlußvolumen der Säule (Fraktionen 40 bis 70) repräsentiert dabei den an Dextran-70 kovalent gebundenen Inhibitor. Der nicht gekoppelte Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor (Fraktionen 80 bis 110) trennt sich auf Grund seines wesentlich niedrigeren Molekulargewichts bei dieser Chromatographie gut von dem makromolekular gebundenen Inhibitor ab. Allerdings konnten wir in den Fraktionen 118 bis 140 eine zusätzlich absorbierende trypsininhibitorisch inaktive Substanz abtrennen. Diese Substanz könnte unter Umständen pyrogene, anaphylaktische und schädigende Wirkung auf Organe, Gerinnung, Kreislauf etc. der Versuchstiere haben. Deshalb halten wir die gelchromatographische Säuberung eines Dextran-70-Inhibitorprotein-Komplexes vor einer intravenösen Injektion als absolut notwendig.

Bezogen auf die Hemmaktivität errechnet sich bei der Kopplungsreaktion eine Ausbeute von mehr als 30 %.

Wie eingangs beschrieben ist der Inhibitor aus Sojabohnen ein Proteinmolekül, das zwei in ihrer Wirkung völlig unterschiedliche Hemmzentren besitzt und dadurch die polyvalenten Hemmeigenschaften dieses Inhibitorproteins bedingt.

So kennen wir ein gegen Trypsin gerichtetes Hemmzentrum ($\text{Lys}^{16}\text{-Ser}^{17}$) wie auch ein gegen Chymotrypsin bzw. Granulozytenelastase gerichtetes Hemmzentrum ($\text{Leu}^{43}\text{-Ser}^{44}$).

Wie aus den Dissoziationskonstanten dieser Enzym-Inhibitor-komplexe hervorgeht (3,32) (Trypsin-Bowman-Birk-Inhibitor-komplex: $K_I = 10^{-10}\text{M}$; Granulozytenelastase-Bowman-Birk-Inhibitor-komplex: $K_I = 10^{-9}\text{M}$) ist die Interaktion zwischen diesen Inhibitoren und den entsprechenden Enzymen sehr stark (Abb. 12 und 13). Diese biologische Aktivität ist auch für den an Dextran-70 gekoppelten Sojabohneninhibitor zur eventuellen pharmakologischen Anwendung Grundbedingung. Deshalb war es notwendig auch mit Dextran-70 gebundenem Inhibitor die Hemmung gegen Trypsin bzw. Granulozytenelastase zu testen (Abb. 12 und 13). Wie aus dieser Titrationskurve zu ersehen ist, entspricht dabei dem ungekoppelten Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor in seiner Hemmwirkung gegen Trypsin bzw. Granulozytenelastase eine 40fach höhere Gewichtsmenge der Dextran-70-Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitorfraktion. Durch quantitative

Aminosäurenanalyse der Dextran-70-Inhibitorfraktion konnten wir wiederum nachweisen, daß nur ein 40stel des Gewichtsan-
teiles aus Inhibitorprotein besteht. Dies bedeutet, daß durch
unsere Koppelungsreaktion weder die Hemmung von Trypsin noch
von Granulozytenelastase durch den Sojabohneninhibitor beein-
trächtigt wird.

Auf Grund des zu erwartenden Molekulargewichtes von ca. 80 000
des Dextran-70-Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor-moleküls ist an-
zunehmen, daß nur ca. $1/4$ der Dextran-70-Moleküle mit Trypsin-
Chymotrypsin-Inhibitor aus Sojabohnen kovalent verknüpft sind.
Der restliche Anteil unserer Dextran-70-Inhibitorfraktion be-
steht aller Wahrscheinlichkeit nach aus inaktiviertem, durch
Gelchromatographie nicht abtrennbarem Dextran-70.

Für unsere pharmakokinetischen Messungen wurden die Frak-
tionen 40 - 58 vereinigt, die Essigsäure mit Ammoniak neu-
tralisiert und um etwa das 25-fache am Rotationsverdampfer
auf 20 ml eingeeengt. Dieses Konzentrat wurde 24 Stunden
gegen destilliertes Wasser dialysiert. Durch Leitfähigkeits-
messung konnte nur noch ein minimaler Salzgehalt nachgewie-
sen werden, anschließend wurde der pH-Wert auf den physiolo-
gischen pH-Wert von 7,4 eingestellt. In dieser Form gelangte
unsere Dextran-70-Inhibitorproteinlösung zur Applikation.

3.3.1.3. Pharmakokinetische Messungen

Der Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus Sojabohnen ist in dieser Dextran-70-Inhibitorverbindung kovalent an das Dextran-70 gebunden (Abb.7, S. 23). Das Molekulargewicht konnte zu $MG = 80\ 000$ durch Gelchromatographie abgeschätzt werden, und liegt deshalb wesentlich höher über der Molekülgröße die in der Niere physiologischerweise filtriert werden kann. Die Ausscheidungsrate sollte deshalb stark verzögert sein. Nach intravenöser Injektion der Dextran-70-Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitorverbindung (Dosis: 10 IU/kg Körpergewicht) in die Ohrvene des Kaninchens sinkt, verglichen mit nativem Inhibitorprotein, die Konzentration dieses Hemmstoffes wie zu erwarten langsamer ab.

Das Verteilungsgleichgewicht zwischen Blut und der extravasalen Flüssigkeit wird, verglichen mit dem nativen Inhibitor, wesentlich später erreicht, nämlich nach ca. 60 Minuten. Nach dieser Zeit nimmt dann die Inhibitorkonzentration sehr langsam ab.

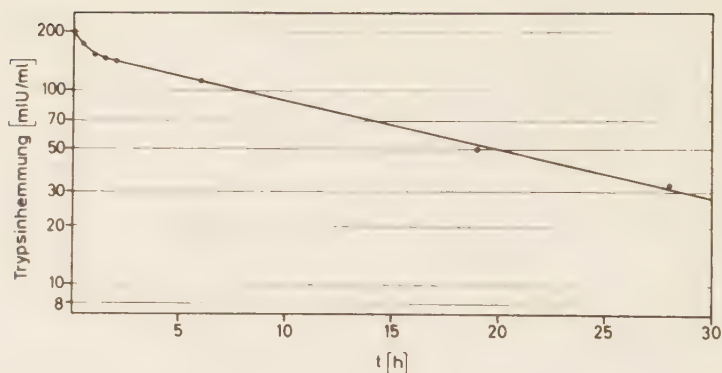


Abb.9 Serum-Inhibitorspiegel bei Kaninchen nach intravenöser Injektion des an Dextran-70 kovalent gebundenen Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitors aus Sojabohnen (Bowman-Birk)
Injizierte Inhibitormenge: 10 IU/kg Körpergewicht

So ist nach einer Stunde p. i. ein Abfall auf 72,2 % der Ausgangsmenge zu verzeichnen, nach 2 Stunden p. i. 65,5 %. Nach 19 Stunden sind noch 21 % im Kreislauf nachweisbar. Die Ausscheidung des an Dextran-70 gekoppelten Proteininhibitors dürfte in diesem Zustand unter physiologischen Bedingungen äußerst minimal sein. Es ist daher neben Metabolismus und Inaktivierung des Proteininhibitors durch Proteasen im intravasalen Raum an einen Abbau des hochmolekularen Dextranträgers durch Glukosidasen oder andere Dextranasen zu denken, die das Dextran-70-Trypsin-Chymotrypsin-

Inhibitormolekül über das Dextran-70 soweit zerkleinern, daß eine Ausscheidung durch die Nieren möglich ist. Im 24-Stunden Harn des Kaninchens fand sich nach Injektion von 10 IU/kg Körpergewicht 52,3 % der Inhibitorausgangsmenge in aktiver Form wieder. Dies kann als Anhalt für den oben erwähnten Ausscheidungsmechanismus gewertet werden. Die Halbwertszeit der Elimination aus der Blutbahn (8) von 12 Stunden errechnet sich aus der Steilheit der Eliminationsgeraden.

3.3.2.1. Charakteristik von Poly-N-vinylpyrrolidon (PVP)

Als weitere hochmolekulare, wasserlösliche Trägersubstanz wurde das als Plasmaexpander bekannte Poly-N-vinylpyrrolidon (PVP) verwendet.

Um das Inhibitorprotein mit dem Poly-N-vinylpyrrolidon kovalent zu verknüpfen, muß das synthetische, inerte Makromolekül aktiviert werden (14,37). Ausgehend von PVP K-15 (Fluka, Schweiz) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 10 000 wird die in der Formel beschriebene Aktivierungsreaktion durchgeführt. Mit Natronlauge kann bei einem Druck von 150 atm unter Stickstoff bei 120 °C der Beta-Laktamring hydrolisiert werden. Durch Methylierung unter Verwendung von Formaldehyd und Natriumborhydrid kann die reaktive, sekundäre Aminogruppe geblockt werden. Der letzte Schritt der Aktivierungsreaktion ist eine Überführung der Carboxylgruppe in einen N-Hydroxysuccinimidester mit Dicyclohexylcarbodiimid und N-Hydroxysuccinimid (Siehe Abb. S. 33).

Nach dieser von v. Specht und Brendel beschriebenen Methode (37) werden ungefähr 5 % der Lactamringe in einen N-Hydroxysuccinimidester übergeführt.

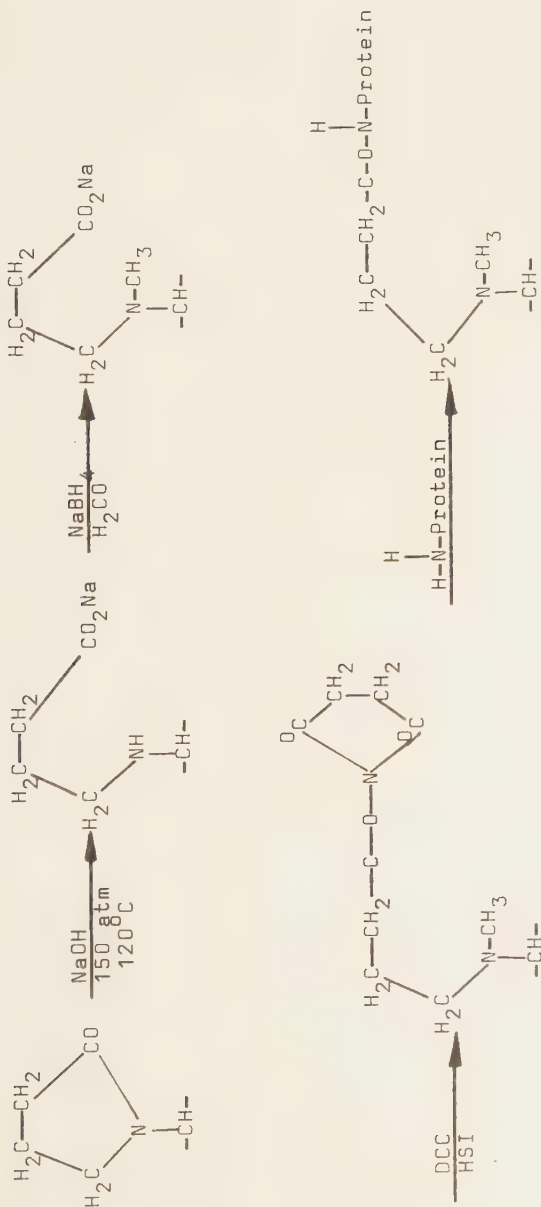


Abb.10 Schema der Reaktionsabläufe zur Präparation des aktiven Poly-N-vinylpyrrolidon

DCC = Dicyclohexylcarbodiimid

HSI = N-Hydroxysuccinimid

3.3.2.2. Darstellung von PVP-gebundenem Bowman-Birk-Inhibitor

Die Koppelung von aktiviertem Poly-N-vinylpyrrolidon an das Inhibitor-molekül wird in Natriumboratpuffer (0,1M; pH = 8,4) durchgeführt. Dabei wird 1 g trockenes Polymer zur Inhibitorlösung (100 mg Bowman-Birk-Inhibitor in 50 ml Boratpuffer) gegeben. Der pH-Wert der Lösung muß nochmals kontrolliert und nötigenfalls mit Natriumtetraborat nachgestellt werden. Die Lösung wird nun auf 4 °C abgekühlt und über Nacht gerührt; anschließend muß durch Zentrifugation unlösliches Material abgetrennt werden. Mittels Druckfiltration durch eine PM-30 Membran (Durchlässigkeitsgrenze für Moleküle mit MG von ungefähr 30 000) wird das Reaktionsgemisch zur Entfernung von nicht umgesetzten Protein, PVP, niedermolekularen Reagentien und Salzen 10 mal mit destilliertem Wasser durchgewaschen und anschließend konzentriert.

Dieses Konzentrat wurde über Sephadex G-75 gelchromatographisch nachgereinigt (Abb. 11). Der Hauptanteil der Trypsin-hemmaktivität wurde dabei im Ausschlußvolumen dieser Trennsäule gefunden.

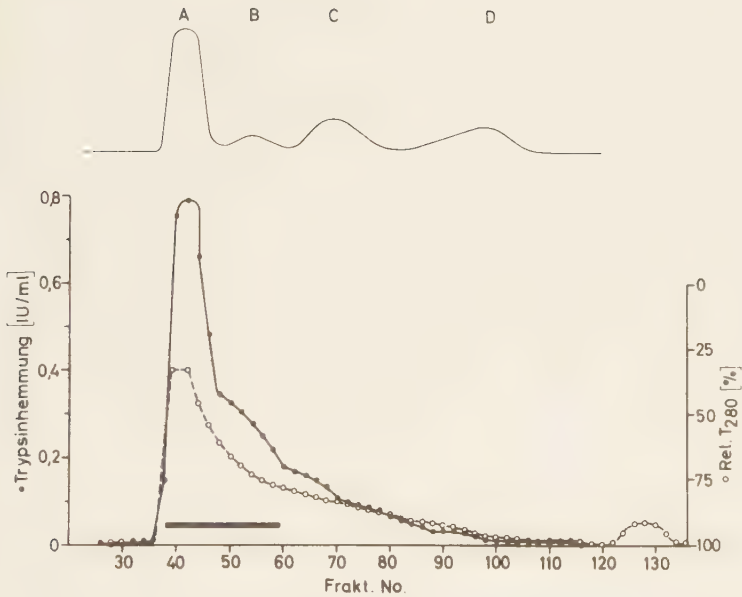


Abb.11 Gelfiltration an Sephadex G-75 des bei Bindung von Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitors aus Sojabohnen aus Poly-N-vinylpyrrolidon entstandenen Reaktionsgemisches.

Säule: 110 x 4,2 cm; 10°C
Fraktionsvolumen: 5 ml;

Flußrate: 140 ml/h
Elutionspuffer: Essigsäure (2%)

Das im oberen Teil der Abbildung sichtbare Elutionsprofil gibt die Kalibrierung der Säule unter den selben Bedingungen wieder.

Eichsubstanzen: A = Dextranblau (Ausschlußgrenze)
B = Trypsin-Inhibitor Ovomucoid (MG: 45000)
C = Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus Sojabohnen (Bowman-Birk) (MG = 8000)

Dies bedeutet, daß das Molekulargewicht der Hauptfraktion des Poly-N-vinylpyrrolidon-Bowman-Birk-Inhibitor-Moleküls (PVP-BBI-Molekül) gleich oder größer als 70 000 ist. Wie auch von anderen Autoren beschrieben (37), entstehen bei der Koppelung von Protein an PVP neben einer hochmolekularen Hauptfraktion Komplexe mit geringerem Molekulargewicht. Dies zeigt sich in unserer Chromatographie in einer Verschiebung der Hemmaktivität von Fraktion 50 bis 100. Für unsere pharmakokinetischen Untersuchungen war die Verwendung eines relativ einheitlichen PVP-Bowman-Birk-Inhibitorpräparates Voraussetzung. Es kam deshalb ein Präparat aus den Fraktionen 38 bis 59 zur Anwendung (siehe Abb.11). Wie aus dieser Abbildung weiterhin hervorgeht war in dem auf die Säule aufgetragenen Konzentrat der Anteil von nativem Bowman-Birk-Inhibitor vernachlässigbar gering, allerdings konnte in den Fraktionen 120 bis 136 eine zusätzlich absorbierende Substanz abgetrennt werden. Sie könnte, wie auch schon unter Kapitel 3.3.1.2. beschrieben, unter Umständen toxische Wirkungen auf Organe, Gerinnung, Kreislauf etc. der Versuchstiere zeigen. Deshalb halten wir auch in diesem Falle die gelchromatographische Säuberung eines PVP-Inhibitorprotein-Komplexes vor einer intravenösen Injektion als absolut notwendig. Insgesamt konnten wir 188,5 IU PVP-Bowman-Birk-Inhibitors, ausgehend von 100 mg BBI (=290 IU), präparieren.

Das entspricht einer Ausbeute über sämtliche Reaktions-schritte von 65 %.

Für die pharmakologische Anwendung des PVP-Bowman-Birk-Inhibitormoleküls ist die biologische Aktivität des Hemmstoffes Grundbedingung. Deshalb war es notwendig auch mit PVP gebundenem Bowman-Birk-Inhibitor die Hemmung gegen Trypsin bzw. Granulozytenelastase zu testen. Wie aus der Titrationskurve (siehe Abb. 13 und 14) zu ersehen ist, entspricht dabei dem ungekoppelten Inhibitorprotein in seiner Hemmwirkung gegen Trypsin bzw. Granulozytenelastase eine 6,5fach höhere Gewichtsmenge der PVP-Bowman-Birk-Inhibitorfraktion. Durch quantitative Aminosäurenanalyse des PVP-Bowman-Birk-Inhibitors konnten wir wiederum nachweisen, daß etwa 15 % des Gewichtsanteiles aus Inhibitorprotein besteht. Dies bedeutet, daß durch unsere Koppelungsreaktion die Hemmung des Bowman-Birk-Inhibitors weder gegen Trypsin noch Granulozytenelastase beeinträchtigt worden ist.

Für unsere pharmakokinetischen Messungen wurde das lyophylierte PVP-Bowman-Birk-Inhibitormolekül (Fraktionen 38 - 59) in 0,9 %iger, physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und der pH-Wert auf den physiologischen pH-Wert 7,4 eingestellt. In dieser Form gelangte unsere Poly-N-vinylpyrrolidon-Bowman-Birk-Inhibitorlösung zur Applikation.

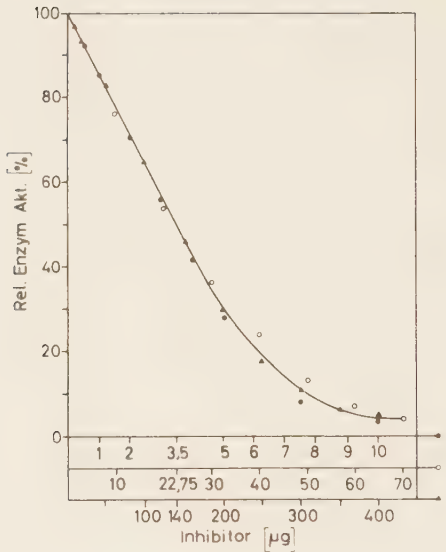


Abb.13 Titration von Trypsin mit nativen bzw. makromolekularen Formen (Dextran-70-BBI, Poly-N-vinylpyrrolidon-BBI) des Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitors aus Sojabohnen.

Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus Sojabohnen (Bowman-Birk-Inhibitor = BBI)

an Poly-N-vinylpyrrolidon gebundener Bowman-Birk-Inhibitor

an Dextran-70 gebundener Bowman-Birk-Inhibitor

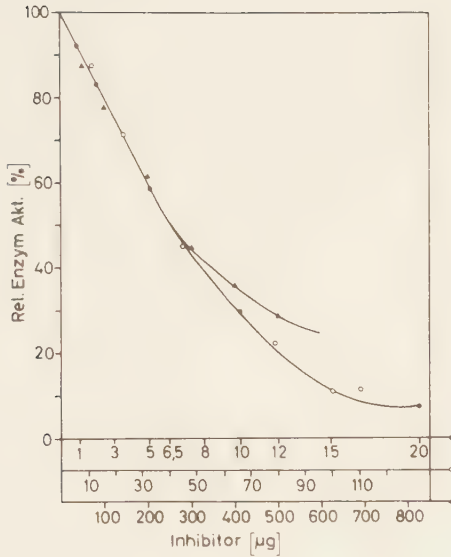


Abb.14 Titration von Elastase aus menschlichen Granulozyten mit nativem Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus Sojabohnen (Bowman-Birk) und dessen gekoppelten Formen (Dextran-70-BBI, Poly-N-vinylpyrrolidon-BBI)

Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus Sojabohnen (Bowman-Birk-Inhibitor = BBI)

an Poly-N-vinylpyrrolidon gebundener Bowman-Birk-Inhibitor

an Dextran-70 gebundener Bowman-Birk-Inhibitor

3.3.2.3. Pharmakokinetische Messungen

In dieser PVP-Bowman-Birk-Inhibitorverbindung ist das Inhibitorprotein kovalent an das PVP gebunden. Das Molekulargewicht konnte wiederum durch Gelchromatographie zu ca. 80 000 abgeschätzt werden und ist naturgemäß durch die Nierenmembran nicht filtrierbar. Die Ausscheidungsrate muß deshalb ähnlich wie bei Dextran-70-Bowman-Birk-Inhibitor, wesentlich verlangsamt werden.

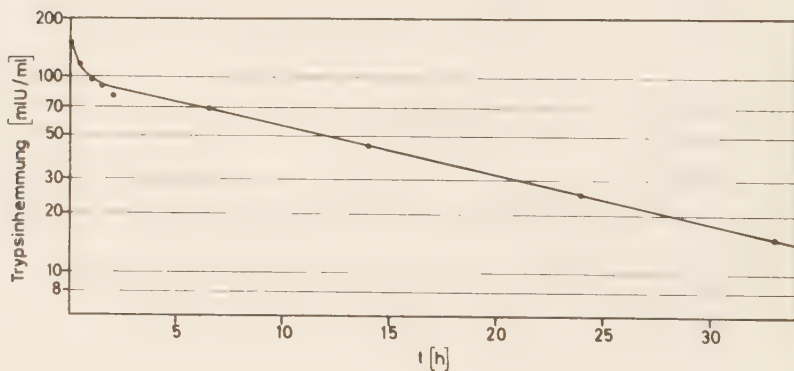


Abb.12 Serum-Inhibitorspiegel bei Kaninchen nach intravenöser Injektion des an Poly-N-vinylpyrrolidon kovalent gebundenen Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitors aus Sojabohnen (Bowman-Birk)
Injizierte Inhibitormenge: 8,8 IU/kg Körpergewicht

Nach intravenöser Injektion der PVP-Inhibitorverbindung (8,8 IU Trypsinhemmaktivität pro kg Körpergewicht) in die Ohrvene bei Kaninchen sinkt, verglichen mit nativem Inhibitor, die Konzentration dieses Proteinhemmstoffes sehr langsam ab (Abb. 12). Die Verteilung des Inhibitors erreicht das Verteilungsgleichgewicht zwischen Blut und extravasaler Flüssigkeit erst nach 60 Minuten. Nach dieser Zeit nimmt dann die Inhibitorkonzentration weiter sehr langsam ab. So ist eine Stunde p. i. der Abfall auf den Wert von 57,4 % der Ausgangsmenge zu verzeichnen; nach 2 Stunden p. i. noch 45,7 %. Nach 33 Stunden sind noch 8,9 % im Kreislauf nachweisbar.

Die Ausscheidung des an Poly-N-vinylpyrrolidon gekoppelten Proteininhibitors dürfte in diesem Zustand unter physiologischen Bedingungen äußerst minimal sein. Es ist daher neben einem Metabolismus und einer Inaktivierung des Proteininhibitors durch Proteasen im intravasalen Raum ein Abbau des hochmolekularen Poly-N-vinylpyrrolidonträgers durch bestimmte Hydrolasen in Betracht zu ziehen, die das Poly-N-vinylpyrrolidon-Bowman-Birk-Inhibitormolekül über das PVP soweit zerkleinern, daß eine Ausscheidung möglich wird. Eine weitere Möglichkeit der Abnahme der trypsininhibitorischen Hemmaktivität aus der Blutbahn dürfte zusätzlich durch die Speicherung des Poly-N-vinylpyrrolidons in den parenchymatösen Organen und dem Retikuloendothelialen System be-

dingt sein.

Im 24-Stunden Harn des Kaninchens fand sich nach Injektion von 8,8 IU/kg Körpergewicht 28,6 % der Inhibitorausgangsmenge in aktiver Form wieder. Dies kann als Anhalt für den oben erwähnten Ausscheidungsmechanismus gewertet werden. Die Halbwertszeit der Elimination aus der Blutbahn von 12 Stunden errechnet sich aus der Steilheit der Eliminationsgeraden (8).

Tabelle 1: Vergleich der Hemmaktivität gegen Trypsin und Elastase der verschiedenen Präparationen des Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitors aus Sojabohnen (BBI)

Inhibitor	Faktor	50 %	50 %
		TRYPSIN-Hemmung (Mikrogramm)	ELASTASE-Hemmung (Mikrogramm)
BBI	-	3,5	6,35
BBI-Dex.70	40	140,0	246,0
BBI-PVP	6,5	22,75	40,0

3.3.3. Proteinmaskierung durch Liposomen

3.3.3.1. Charakteristik der Liposomen

Unter Liposomen versteht man eine strukturelle Anordnung von Phospholipiden und anderen Lipiden, die zu einer biomolekularen Konfiguration führen und keinerlei Unterstützung für ihre Stabilität benötigen. Sie bilden sich, wenn wasserlösliche, polare Lipide wie z. B. Phosphatidyläthanolamin, -Cholin, -Serin oder -Cardiolipin mit Wasser in Berührung kommen und dabei eine Folge von sphärischen Zusammenballungen durchlaufen. Das endgültige Resultat dieser Reaktion ist ein System von konzentrisch geschlossenen Membranen mit einem Durchmesser von etwa 0,15 Mikrometer; jede repräsentiert eine ununterbrochene, bimolekulare Schicht von Molekülen. Diese konzentrischen Sphären alternieren mit wässrigen Kompartimenten (15,42) (siehe Abb. 15).

Die Verwendung von Liposomen als Vehikel zur Gabe von therapeutischen Agentien beruht darauf, daß in die wässrige Phase dieser Lipidstrukturen wasserlösliche Substanzen eingebaut werden können. Diese Substanzen können nicht mit den Lipiden reagieren, die Liposomenstruktur bleibt also erhalten.

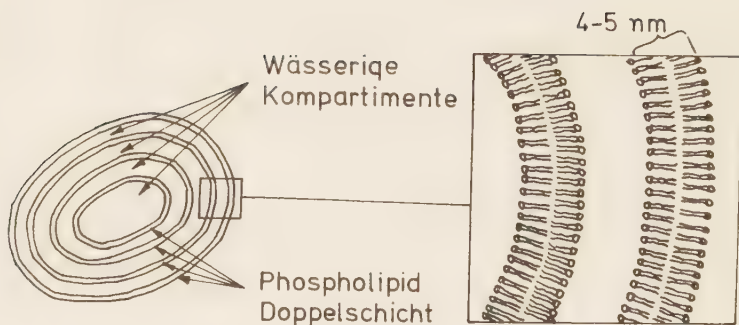


Abb.15 Schematische Darstellung der Liposomenstruktur.
In die wässrigen Kompartimente können wasserlösliche Substanzen eingelagert werden.

3.3.3.2. "Maskierung" des Bowman-Birk-Inhibitors in Liposomen

Die Synthese der Liposomen wurde nach einer Methode von Gregoriadis und Mitarbeiter (15) durchgeführt.

40 mol = 31 mg Phospholipid-Hühnereilecithin; 11,4 mol Cholesterol = 4,3 mg und 5,7 mol Dicetylphosphat = 3,1 mg werden in 3 ml Chloroform aufgelöst.

Der 50 ml Rundkolben in dem nun die anschließende Reaktion durchgeführt wird, wurde vorher mit dem Detergens Triton X-100

gereinigt, weiterhin mit destilliertem Wasser gut ausgespült und getrocknet. Unter Durchspülen von nachgereinigtem Stickstoff wird die Chloroformlösung am Vakuumverdampfer bei 37° C einrotiert. Dabei bildet sich ein gleichmäßiger Film an der Glaswand des Kolbens. Um das Lösungsmittel vollständig abzdampfen wird die Vakuumrotation für weitere 10 Minuten fortgeführt. Nun wird der Kolben unter Durchspülen von Stickstoff vom Rotationsverdampfer abgenommen und das in 2 ml Natriumphosphatpuffer (3 mMol; pH = 7,2) gelöste Inhibitorprotein zugegeben. Der Kolben wird luftdicht abgeschlossen und solange leicht geschüttelt, bis sich die Lipidschicht von der Kolbenwand ablöst und im Puffer dispergiert. Die milchigtrübe, liposomale Suspension läßt man dann für 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen, sodaß sich die multilamellären Liposomen vollständig ausbilden können.

Die dabei erhaltenen Liposomen sind auf Grund ihrer Strukturgröße (Durchmesser: einige Mikrometer) zur intravenösen Injektion ungeeignet. Kleinere multilamelläre Liposomen werden durch Ultraschallbehandlung erhalten (Ultraschallgerät von Bronson Sonic Power). Dies gelingt durch Ultrabeschallung bei maximaler Kraft in 30 Sekundenintervallen, die durch 50-sekundige Phasen unterbrochen werden. Nach weiterem einstündigen Stehen bei Raumtemperatur erfolgt nun die

Abtrennung des liposomalmaskierten Inhibitors von nicht eingeschlossenem Inhibitor. Dies gelingt durch Gelchromatographie an Biogel A 5 m in Natriumphosphatpuffer (5 mMol; pH = 7,2).

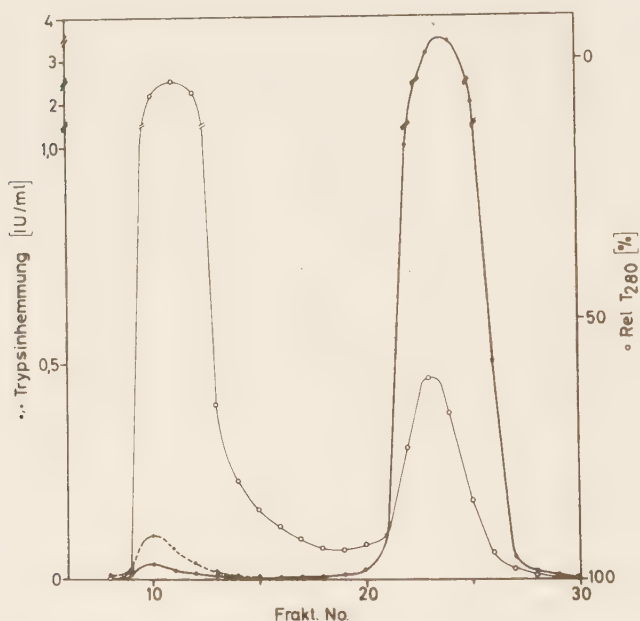


Abb.16 Gelchromatographie an Biogel A 5m des bei Einlagerung von Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus Sojabohnen in liposomalen Strukturen entstandenen Reaktionsgemisches.

Säule: 58 x 1 cm; 10°C
 Fraktionsvolumen: 0,5 ml
 Flußrate: 7 ml/h
 Elutionsmittel: BS-Puffer

—●— freier Inhibitor
 - - - x - - - Liposomal eingelagerter Inhibitor. Nachweis durch Trypsinhemmttest nach Behandlung mit 0,1 % Triton X-10C

Wie aus der Abbildung Nr. 16 hervorgeht, wird der liposomal-maskierte Inhibitor im Fraktionenbereich 9 - 14 eluiert, der nicht gebundene Inhibitor trennt sich von der milchigtrüben Liposomenfraktion bei Fraktionen Nr. 20 bis 27.

Durch Inkubation (10 Min.) der Liposomen mit Detergens (0,1 %iger, wässriger Lösung von Triton X-100) werden diese Lipidstrukturen zerstört, und die gesamte liposomalgebundene Proteinmenge kann durch einen Trypsinhemmttest bestimmt werden. Bei einer Ausgangsmenge von 28,5 IU Bowman-Birk-Inhibitor konnten wir 0,848 IU liposomalgebundenen Bowman-Birk-Inhibitor nachweisen. Dies entspricht einer Ausbeute von ca. 3 %, was gut mit den in der Literatur beschriebenen Werten für den Proteineinbau in diese Lipopolysacharidstrukturen übereinstimmt (42).

4. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, die Verwendbarkeit von pflanzlichen Proteinaseinhibitoren und verschiedenen makromolekularen Derivaten als spezifische Regulatoren der neutralen Leukozytenproteasen im Tierorganismus zu untersuchen. Neben den pharmakokinetischen Eigenschaften war für uns deshalb auch die kurzfristige Verträglichkeit dieser Proteine für den Organismus von Interesse. Andererseits sollte durch möglichst geringe Kosten und Arbeitsaufwand eine anwendbare Präparation dieser Hemmstoffe zur Verfügung stehen. Wir entschlossen uns zur Verwendung eines Rohpräparates, des Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitors aus Sojabohnen (Bowman-Birk), das im Handel angeboten wird. Durch eine einfache Gelchromatographie dieses Rohpräparates stand ein Präparat mit einer für uns ausreichenden Reinheit zur Verfügung. Eine ursprünglich vorgenommene Affinitätschromatographie dieses Proteinrohpräparates an wasserlöslichem Trypsinharz erwies sich auf Grund der schlechten Ausbeute und der vergleichbaren Anreicherungsquote zur Gelchromatographie als nicht brauchbar.

Die von uns herangezogenen Reinheitskriterien des Präparates, wie quantitative Aminosäureanalyse und die Bestimmung der

spezifischen Trypsinhemmaktivität (2,9 mIU/mg), zeigten uns, daß eine weitgehende Homogenität des Präparates anzunehmen war. Verunreinigungen, die pyrogen, anaphylaktisch oder auch toxisch auf die Organe der Versuchstiere wirken, konnten deshalb nahezu ausgeschlossen werden, was auch in den Versuchen selbst bestätigt wurde.

Auf Grund der kleinen Molekülgröße des Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitors aus Sojabohnen (MG = 8000) war zu erwarten, daß dieses Inhibitorprotein in den Nieren glomerulär filtriert wird und deshalb eine kurze Verweildauer im Blutkreislauf zeigt. Die Bestimmung der Eliminationsrate im Hunde- und Kaninchenkreislauf hat diese Vermutung voll bestätigt. Wie beim basischen Trypsin-Inhibitor aus Rinderlunge (Trasylol^R, MG = 6500) ist die Ausbildung des Verteilungsgleichgewichtes zwischen externem Kompartiment und Kreislauf nach bereits 30 Minuten erreicht. Trasylol zeigt allerdings auf Grund seiner starken Basizität einen möglichen toxischen Effekt auf die glomerulären Membranen der Nieren, was durch die selektive Anreicherung in diesem Organ und auch durch den histologischen Nachweis nachgewiesen werden konnte (13). Der Sojabohneninhibitor (Bowman-Birk) zeigt nach intravenöser Applikation keine spezifische Anreicherung in einem bestimmten Organ. Die Konzentration in Leber, Lunge und Milz übertraf zu keinem Zeitpunkt der Versuchsdauer 1 % der injizierten Ausgangsmenge. Die maximale Inhibitorkonzentration

in der Niere fällt zudem mit der Zeit der höchsten Filtrationsrate dieses Hemmstoffes zusammen. Nach 24 Stunden wurden 57 % der Inhibitorausgangsmenge im Harn in aktiver Form nachgewiesen. Wie von Fritz und Mitarbeitern (13) mit verschiedenen Trasyololpräparaten gezeigt wurde, ist die Ablagerung dieses Hemmstoffes und seine Ausscheidung im Harn von der individuellen Basizität des Proteinhemmstoffes abhängig. Mit abnehmender Basizität kann bei gleicher Molekülgröße die Ausscheidung im Harn ständig verbessert werden. Der Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus Sojabohnen weist einen Isoelektrischen Punkt von 4,2 auf und ist deshalb auch, wie wir zeigen konnten, in der Niere voll filtrierbar. Die Funktion dieses Ausscheidungsorgans, aber auch anderer Organe werden nach unseren Ergebnissen durch dieses Protein auf Grund einer spezifischen Anreicherung nicht beeinflusst. Allerdings ist die Frage nach der immunologischen Sensibilisierung durch diesen Inhibitor und eventuell damit verbundenen Folgen bei längerer Anwendung dieses Proteins noch nicht zu beantworten.

Die kurze Verweildauer dieses Hemmstoffes in der Blutbahn erfordert bei therapeutischer Anwendung eine exakte und ständig kontrollierte Dauerdosierung. Zusätzlich ergeben sich für dieses Präparat bei einer langfristig erforderlich hohen Dosierung finanzielle Probleme. Durch die Verknüpfung dieses Inhi-

bitorproteins mit hochmolekularen, löslichen, aber biologisch weitgehend inerten Trägersubstanzen kann dieses Problem bewältigt werden. Mit an Dextran-70 bzw. Poly-N-vinylpyrrolidon gekoppelten Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus Sojabohnen kann über 6 bis 8 Stunden eine konstante Inhibitorkonzentration nach einer einmaligen, intravenösen Gabe des Hemmstoffes erreicht werden.

Wie wir zeigen konnten errechnet sich die Halbwertszeit aus dem Blutkreislauf dieser Inhibitor-Dextran-70 bzw. Poly-N-vinylpyrrolidonkomplexe zu ungefähr 12 Stunden. In weiteren Untersuchungen muß nun geklärt werden, über welchen möglichen Mechanismus die Abnahme der Inhibitorkonzentration im Blutkreislauf und eine langsame Ausscheidung im Urin verursacht wird. Dabei kann z. B. an die hydrolytische Spaltung der Dextranketten bzw. Poly-N-vinylpyrrolidonpolymere durch spezifische Dextranasen oder andere unspezifische Hydrolasen gedacht werden. So könnte nach entsprechendem Abbau der Dextran bzw. Poly-N-vinylpyrrolidon-Trägermatrix das makromolekulare Inhibitormolekül wieder nierengängig werden. Als weitere Möglichkeit ist die Wirkung einer Protease in Betracht zu ziehen, die die Peptidbindungen des Inhibitorproteins in unmittelbarer Nachbarschaft zur Trägermatrix oder eventuell die Amidbindung der endterminalen Asparaginsäure zum Dextran bzw. Poly-N-vinylpyrrolidon zu spalten in der Lage ist.

Dextran-70 und Poly-N-vinylpyrrolidon sind als Plasmaersatzmittel besonders im Schock wirksam. Von Dextran ist kein nachteiliger Einfluß auf die Funktion der parenchymatösen Organe bekannt. Es kann gelegentlich Antigeneigenschaften besitzen, die vom Reinheitsgrad des Präparates abhängig zu sein scheinen; Überempfindlichkeitsreaktionen wurden beobachtet. Im Gegensatz zu Poly-N-vinylpyrrolidon wird Dextran in keinem Organ gespeichert. (Weiterhin kann sich eine Gabe der Inhibitor Dextran- bzw. Inhibitor-Poly-N-vinylpyrrolidon-moleküle bei bestimmten Schockformen günstig auf die dabei eintretende Änderung der Suspensionsstabilität des Blutes auswirken, welche für das sog. "sludge Phänomen" verantwortlich ist). Eine weitere wesentliche Funktion des Dextrans beim Schock ist die starke Senkung der Blutviskosität und eine dadurch bedingte Verbesserung der Mikrozirkulation und des venösen Rückstroms. Zu bedenken ist, daß Dextran in seiner Verträglichkeit spezieabhängig ist. Für Ratten ist Dextran ausgesprochen giftig, eine örtliche Injektion bewirkt die Ausbildung eines Ödems. Poly-N-vinylpyrrolidon ist ähnlich wie das Dextran als Plasmaersatzmittel geeignet. Es besitzt keinerlei antigene Eigenschaften. Ein Teil soll aber durch Makophagen aufgenommen werden. Das Schicksal von Poly-N-vinylpyrrolidon im Organismus ist unbekannt. Ein sekundärer Abbau dieses Polymers durch unspezifische Hydrolasen wird diskutiert. Eine funktionelle

Schädigung des RES durch die Speicherung ist bisher nicht festgestellt worden. Da sich Liposomen in bestimmten Organen wie Leber und Milz anreichern, sind sie möglicherweise als gerichtete, therapeutische Vehikel besonders im Schock geeignet. Die Leber und auch andere Organe wie Niere und Lunge sind als sog. Schockorgane bei diesen pathophysiologischen Vorgängen besonders betroffen. Die Durchblutung dieser Organe ist vermindert; außerdem zeigt sich in diesen Organen eine massive Ansammlung von Granulozyten, die vermehrt degranuliert werden und ihre lysosomale Enzymausstattung freisetzen. In den Organen könnte mit Hilfe der in den Liposomen eingelagerten Enzymhemmstoffe eine unmittelbare Schädigung durch Leukozytenenzyme verhindert werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Die neutralen Leukozytenproteasen wie Elastase und Kathepsin-G sind ursächlich am Pathomechanismus von verschiedenen Krankheitsbildern wie z. B. Gerinnungsstörungen in der gramnegativen Sepsis oder akuten myeloischen Leukämie beteiligt. In vitro konnte festgestellt werden, daß diese Proteasen mit niedermolekularen, säurestabilen Inhibitoren aus Leguminosen wie dem Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus Sojabohnen (Bowman-Birk-Inhibitor) bzw. Lima-bohnen stabile Komplexe eingehen.

Um nun diese Inhibitoren als wirksame Regulatoren der neutralen Proteasen in vivo einsetzen zu können, ist die Bestimmung der Pharmakokinetik dieser Proteine im Tiermodell notwendig.

Für die pharmakokinetischen Untersuchungen an Kaninchen, Hunden und Ratten wurden käufliche Präparate verwendet, die nach Gelchromatographie nahezu einheitlich waren. Als Reinheitskriterium wurde die Bestimmung der spezifischen Trypsinhemmaktivität bzw. die quantitative Aminosäure-

analyse herangezogen.

Sojabohneninhibitor (MG = 8000) und Limabohneninhibitor (MG = 9000) zeigen im Hunde- bzw. Kaninchenkreislauf nahezu übereinstimmende pharmakokinetische Eigenschaften. So stellte sich für beide Inhibitoren im Hunde- und Kaninchenkreislauf das Verteilungsgleichgewicht zwischen Blut- und dem extravasalen Kompartiment nach ca. 30 Min. ein. Für die Elimination dieser Inhibitorproteine durch die Niere errechnete sich eine Halbwertszeit von 65 Min.. Zudem wurde bei Ratten festgestellt, daß diese Inhibitoren nicht selektiv bestimmten Organen angereichert und vollständig in ihrer biologisch aktiven Form über die Niere ausgeschieden werden.

Die relativ kurze Verweildauer dieser Inhibitorproteine im Blutkreislauf erschwerte ihre exakte Dosierung als Therapeutikum und wirft für dieses Präparat bei einer langfristig erforderlichen Dosierung finanzielle Probleme auf. Der Sojabohneninhibitor wurde deshalb an lösliche, biologisch inerte Trägermaterialien, wie Dextran-70 und Poly-N-vinylpyrrolidon, kovalent gebunden. Dabei wurde das Inhibitorprotein mit einer Ausbeute von ca. 30 % an BHP-aktiviertes Dextran-70, mit einer Ausbeute von 65 % an aktiviertes Poly-N-vinylpyrrolidon gebunden. Durch Gelchromatographie konnte für beide Inhibitor-

trägerkomplexe ein Molekulargewicht von etwa 80 000 abgeschätzt werden.

Das Verteilungsgleichgewicht für das Dextran-70-Bowman-Birk-Inhibitormolekül bzw. Poly-N-vinylpyrrolidon-Bowman-Birk-Inhibitormolekül wird im Kaninchenkreislauf nach 60 Min. erreicht. Die Halbwertszeit der Elimination aus der Blutbahn ergibt für beide Verbindungen Werte von ca. 12 Stunden. Im 24-Stunden-Harn des Kaninchens wurden etwa 50 % Hemmaktivität des intravenös applizierten Dextran-70-Bowman-Birk-Inhibitormoleküls und 30 % des intravenös applizierten Poly-N-vinylpyrrolidon-Bowman-Birk-Inhibitormoleküls wiedergefunden.

Als weitere Möglichkeit einer hochmolekularen, nicht nierengängigen Depotform des Inhibitorproteins wurde die "Verpackung" dieses Inhibitors in Liposomen versucht. Im Gegensatz zur kovalenten Verknüpfungsreaktion an Dextran-70 oder Poly-N-vinylpyrrolidon ergab die "Maskierung" des Inhibitors in den liposomalen Strukturen nur eine Ausbeute von 3 % und war deshalb aus Kostengründen im Tiermodell nicht anwendbar.

6. VERZEICHNIS DER IM TEXT VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

Aminosäuren werden mit den drei Anfangsbuchstaben bezeichnet

BBi Bowman-Birk-Inhibitor

IU Inhibitor Unit

mIU milli-Inhibitor Unit

p. i. post injektionem

PVP Poly-N-vinylpyrrolidon

RES Retikuloendotheliales System

5. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Axen, R. and Ernback, S.: Chemical Fixation of Enzymes to Cyanogen Halide Activated Polysaccharide Carriers, Eur. J. Biochem. 18, 351 - 360 (1971).
- 2 Baugh, R. J. and Travis, J.: Human Leukocyte Granule Elastase: Rapid Isolation and Characterization, Biochem. 15, 836 - 841 (1976).
- 3 Birk, Y.: Structure-Activity Relations Hips of Several Trypsin and Chymotrypsin Inhibitors from Legume Seeds, in Proteinase Inhibitors, Proc. Int. Res. Conf., and (Bayer Symp. V), Grosse Ledder, 1973, p. 355 - 361, Springer Verlag, Berlin and New York, 1974.
- 4 Birk, I., Gertler, A. and Khalef, S.: Biochem. J. 87, 281 - 284 (1963).

- 5 Birk, I. and Gertler, A.: Biochem. Prep. 12, 25 - 29 (1968).
- 6 Cline, M. I.: The White Cell; Harvard University Press, Cambridge, Mass, (1975).
- 7 Colley, C. M. and Ryman, B. E.: The Liposome: From Membrane Model to Therapeutic Agent, TIBS Sept. 1976, 203 - 205 (1976).
- 8 Dost, F. H.: Grundlagen der Pharmakokinetik, 2. Auflage, S. 36, 238, 276, Georg-Thieme-Verlag Stuttgart, (1968).
- 9 Feinstein, G. and Janoff, A.: A Rapid Method for Purification of Human Granulocyte Cationic Neutral Proteases: Purification and Characterization of Human Granulocyte Chymotrypsin-Like Enzyme, Biochem. Biophys. Acta, 403, 477 - 492 (1975).
- 10 Fritz, H. and Tschesche, H.: Proc. Internat. Res Conf. on Protease Inhibitors, de Gruyter, Berlin, (1971).
- 11 Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L. J. and Truscheit, E.: Protease Inhibitors, Bayer Symposium V, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, (1974).

- 12 Fritz, H., Trautschold, I. und Werle, E.: "Protease Inhibitoren" in: Bergmeyer, H. Cl., "Methoden der enzymatischen Analyse", 1021 - 1038, Weinheim/Bergstraße, Verlag Chemie, (1970).
- 13 Fritz, H., Oppitz, K. H., Meckl, D., Kemkes, B., Händle, H., Schulet, H. und Werle, E.: Verteilung und Ausscheidung von natürlich modifizierten Proteinaseinhibitoren nach intravenöser Injektion bei Ratte, Hund (und Mensch), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1541 - 1550 (1969).
- 14 Geiger, B., v. Specht, B. U. and Arnon, R.: Stabilization of Human Beta-D-N-Acetylhexosaminidase, a Towards Proteolytic Inactivation by Coupling it to Poly (N-vinyl-) pyrrolidones, Eur. J. Biochem. 73, 141 - 147, (1977).
- 15 Gregoriadis, G., Leathwood, P. D. and Ryman, B. E.: Enzyme Entrapment in Liposomes, Febs Letters 14, 95 - 99.
- 16 Havemann, K. and Janoff, A.: Neutral Proteases of Human Polymorphonuclear Leukocytes; Urban and Schwarzenberg, Baltimore, München, (1978).

- 17 Lieberman, I.: Involvement of Leukocytic Proteases in Emphysema and Antitrypsin Deficiency, Arch. Environ Health 27, 196 - 200 (1973).
- 18 Marshall, J. and Rabinowitz, L. M.: Preparation and Characterization of an Dextran-Trypsin Conjugate, I. Biol. Chem. 251, 1081 - 1087 (1976).
- 19 Melmon, K. L. and Cline, J. M.: The Interaction of Leukocytes and the Kinin System, Biochem. Pharmac., Supplement, pp. 271 - 281 (1968).
- 20 Melmon, K. L. and Cline, J. M.: Interaction of Plasma Kinins and Granulocytes, Nature 7, 90 - 92, (1967).
- 21 Odani, S. and Ikenaka, I. U.: Studies on Soybean Trypsin Inhibitors IV. Complete Amino Acid Sequence and the Anti-proteinase Sites of Bowman-Birk Soybean Proteinase Inhibitor, Biochem. 71, 839 - 848.
- 22 Odani, S., Ikenaka, T., J.: Studies on Soybean Trypsin Inhibitors VIII. Disulfide Bridges in Soybean Bowman-Birk Proteinase Inhibitor, Biochem. 74, 697 - 715, (1973).

- 23 Ohlsson, K. and Olsson, I.: The Neutral Proteases of Human Granulocytes Isolation and Partial Characterization of Two Granulocyte Collagenases, Eur. J. Biochem. 36, 473 - 481, (1973).
- 24 Ohlsson, K. and Olsson, I.: The Neutral Proteases of Human Granulocytes Isolation and Partial Characterization of Granulocyte Elastases, Eur. J. Biochem. 42, 519 - 527, (1975).
- 25 Uhlsson, K.: Interaction of Granulocyte Neutral Proteases with Alpha₁-antitrypsin, Alpha₂-Makroglobulin and Alpha₁-antichymotrypsin, in (45), 167 - 177, (1978).
- 26 Uhlsson, K. and Laurell, C. B.: The Disappearance of Enzyme-Inhibitor-Complexes from the Circulation, Clin. Sci. Mol. Med. 51, 87 - 92, (1976).
- 27 Ohlsson, K., Olsson, I., Delshammar, M. and Schießler, H.: Elastases from Human and Canine Granulocytes, I. Some Proteolytic and Estereolytic Properties, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1245 - 1250, (1976).

- 28 Plow, F. and Edington, T. S., Cline, J.: An Alternative Pathway for Fibrinolysis: The Cleavage of Fibrinogen by Leukocyte Protease at Physiologic pH, Invest 56, 30 - 38, (1975).
- 29 Schiessler, H., Arnhold, M., Ohlsson, K. and Fritz, H.: Inhibitors of Acrosin and Granulocyte Proteases from Human Genital Tract Secretions, Hoppe-Seyler's Z., Physiol. Chem. 357, 1251 - 1260, (1976).
- 30 Schiessler, H.: Säurestabile Proteinaseinhibitoren aus menschlichem Sperma und ihre Zielenzyme, Fortschritte der And. 5, 45 - 102, (1976).
- 31 Schiessler, H., Hochstrasser, K. and Ohlsson, K.: Acid-Stable Inhibitors of Granulocyte Neutral Proteases in Human Genital Tract Secretions, in (16), 195 - 207, (1978).
- 32 Schiessler, H., Ohlsson, K., Olsson, I. Arnhold, M., Birk, Y. and Fritz, H.: Elastases from Human and Canine Granulocytes, II. Interaction with Protease Inhibitors of Animal, Plant and Microbial Origin, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 53 - 58, (1977).

- 33 Schmidt, W. and Egbring, R. and Haveman, K.: Effect of Elastase-Like and Chymotrypsin-Like Neutral Proteases from Human Granulocytes on Isolated Clotting Factors, *Tromb. Res.* 6, 315 - 316, (1975).
- 34 Seemüller, U., Meier, M., Ohlsson, K., Müller, H. P. and Fritz, H.: Isolation and Characterization of a Low Molecular Weight Inhibitor (of Chymotrypsin and Human Granulocytic Elastase and Cathepsin G) from Leeches, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem.* 358, 1105 - 1117, (1977).
- 35 Siu-Cheung Tam., Blumenstein, I. and Tze-Fei-Wong, I.: Soluble Dextran-Haemoglobin Complex as a Potential Blood Substitute, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2128 - 2131, (1976).
- 36 Salomon, A.: Possible Role of PMN - Proteases in Immunoglobulin Degradation and Amyloid Formation, *in* (16), 423 - 436, (1978).
- 37 v. Specht, B. U., Kolb, H. J., Renner, R. and Hepp, K. D.: Preparation and Physical-Chemical Characterization of PVP-Insulin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359, 231 - 238, (1978).

- 38 Starkey, P. M.: Elastase and Cathepsin G, the Serine Proteinases of Human Neutrophil, in: Proteinases in Mammalian Cells and Tissues (A. J. Barrett, ed.) North-Holland Publishing Company Amsterdam, New York, Oxford, 57 - 90, (1977).
- 39 Starkey, M. and Barrett, A. J.: Human Lysosomal Elastase; Catalytic and Immunological Properties, Biochem. J. 155, 265 - 271, (1975).
- 40 Starkey, M. and Barrett, J. A.: Human Cathepsin G; Catalytic and Immunological Properties, Biochem. J. 155, 273 - 278, (1975).
- 41 Stevens, F. C.: Lima Bean Protease Inhibitor: Amino Acid Sequence and Active Sites against Trypsin and Chymotrypsin, in (10), 149 - 168, (1971).
- 42 Tyrrell, D. A., Heath, T. D., Colley, C. M. and Ryman, E. B.: New Aspects of Liposomes, Biochemica et Biophysica Acta, 457, 259 - 302, (1976).
- 43 Venge, P.: Polymorphnuclear Leukocyte Proteases and their Effect on Complement Components and Neutrophil Function, in (16), 264 - 275, (1978).

- 44 Venge, P. and Olsson, I.: Cationic Proteins of Human Granulocytes VI. Effects on the Complement System and Mediation of Chemotactic Activity, The Journal of Immunology 115, 1505 - 1508, (1975).
- 45 Vogel, R., Trautschold, I. and Werle, E.: Natural Proteinase Inhibitors, Academic Press, New York, (1968).

Danksagung

Diese Arbeit entstand unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Fritz in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik der Universität München. Herrn Prof. Dr. H. Fritz danke ich für die Überlassung des Themas und den mir zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Meinem Freund, Herrn Dr. H. Schiessler bin ich für die wissenschaftliche Anleitung und die großzügige Unterstützung während der gesamten Dauer dieser Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. v. Specht danke ich für die Unterstützung bei der Koppelung des aktivierten PVP.

Meinem Studienfreund, Herrn Otto-Max Kaplan sei für die Teilnahme an den Tierversuchen und fruchtbaren Diskussionen gedankt. Zum Schluß möchte ich noch allen Mitarbeitern am Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie für ihre kollegiale Zusammenarbeit meinen herzlichen Dank aussprechen.

LEBENS LAUF

Am 30. Mai 1950 wurde ich als Sohn des Polizeihauptwachtmeisters Bernhard Wartenberg und seiner Frau Maria Elisabeth geborene Lazar, in Nieder-Lazisk in OS. geboren. Hier besuchte ich von 1957 - 1964 die Hauptschule und anschließend das Brauereitechnikum in Tichau, an dem ich 1969 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1970 begann ich an der Technischen Universität in Gleiwitz das Studium der Chemie. Am 10.12.1971 siedelte ich in die Bundesrepublik Deutschland über, wo ich Anfang 1973 nach einsemestrigem Besuch eines Studienkollegs in Darmstadt die Allgemeine Hochschulreife erlangte. Im Wintersemester 1973/74 begann ich an der Ludwig-Maximilian Universität München das Studium der Human-Medizin, bestand im März 1976 die Ärztliche Vorprüfung, im März 1977 den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und im März 1979 den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Seit November 1976 arbeite ich am Institut für Klinische-Chemie und Klinische-Biochemie der Universität München an meiner Doktorarbeit. Im Dezember 1978 heiratete ich Beate Mayer.

